

На правах рукописи

ЗАМАЛЮТДИНОВА НАИЛЯ МАРСОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ИНВАЗИВНОЙ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
PROTEUS MIRABILIS И *MORGANELLA MORGANII***

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в лаборатории междисциплинарного центра протеомных исследований (КФУ) в рамках Open Lab «Микробные биотехнологии» (КФУ)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент,
Марданова Айслу Миркасымовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой биологической и неорганической химии факультета биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»
Алимов Азат Миргасимович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы «Банк клеточных культур» Центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» Отдела клеточных культур ФГБУН Института цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург
Ефремова Татьяна Николаевна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «**Казанская государственная медицинская академия**» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань

Защита диссертации состоится «24» марта 2016 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии, ауд. 205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «_____» 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

В последние десятилетия значительно повысилась этиологическая роль условно-патогенных бактерий в инфекционной патологии человека, а также расширился клинический спектр проявлений этих инфекций (Spencer et al., 2014; Fadeyibi et al., 2013; Jockenhöfer et al., 2014; Gandham et al., 2014; Tsai et al., 2013). Условно-патогенные бактерии являются важными возбудителями оппортунистических инфекций, лечение которых представляет собой актуальную проблему современного здравоохранения и требует дальнейших усилий на пути разработки новых подходов и поиска новых мишеней (Rani et al., 2015). Это обуславливает необходимость углубления наших знаний о молекулярно-биологических основах вирулентности условно-патогенных бактерий и особенностях патогенеза инфекций, вызванных этими возбудителями.

Особое внимание привлекают уропатогенные штаммы рода *Proteus* и *Morganella*, вызывающие инфекции мочевыводящих путей, относящихся к наиболее распространенным оппортунистическим инфекциям (Kochiashvili et al., 2014). Как правило, уропатогенные бактерии подвижны и способны выживать в моче, что обеспечивает им быструю адгезию и колонизацию поверхности эпителия и катетеров. Уже во время адгезии на поверхности эукариотической клетки запускается механизм инвазии, что позволяет микроорганизму выживать и размножаться внутри макроорганизма, укрываться от действия антибиотиков (Mathoera, 2002; Alamuri et al., 2010).

В литературе мало данных об инвазивной способности бактерий рода *Proteus* и отсутствуют данные по инвазии *Morganella*. Не известен вклад протеолитических ферментов в инвазивный потенциал этих бактерий.

Инвазия *P. mirabilis* в эукариотические клетки является важным шагом к развитию инфекции (Finlay, Falkow, 1989; Finlay, 1990). Имеются данные о подавлении в присутствии р-нитрофенилглицерина инвазии *P. mirabilis*, а также синтеза данным микроорганизмом уреазы, протеиназы и гемолизина (Liaw et al., 2000; Liaw et al., 2001). Недавно установлено, что экспрессия гена σ -фактора RpoE, выступающего посредником при инвазии бактерий, индуцируется мочевиной (Liu et al., 2015). Анализ немногочисленных данных литературы по изучению инвазии *P. mirabilis* в эукариотические клетки позволяет предположить взаимосвязь процесса инвазии с синтезом большого количества факторов вирулентности, в частности, внеклеточной протеиназы (Jiang et al., 2010a; Jiang et al., 2010b). Внеклеточная металлопротеиназа ZapA *P. mirabilis* активно изучалась в 1990-х гг (Senior et al., 1991; Loomes et al., 1993; Allison et al., 1994; Wassid et al., 1995; Senior, 1999). Предполагается, что протеиназа ZapA может отвечать за протеолиз антимикробных пептидов в мочевыводящих путях (Belas et al., 2004). Несмотря на длительное исследование металлопротеиназы *P. mirabilis*, многие вопросы остаются без ответов. Например, неясна причина

образования изоформ фермента, регуляция экспрессии фермента *in vivo*, недостаточно данных о роли фермента в патогенезе (Pearson et al., 2011).

В настоящее время зарубежные исследователи ведут поиск ингибиторов активности металлопротеиназы *P. mirabilis* в условиях *in vivo* (Phan et al., 2008; Carson et al., 2011); исследуются механизмы регуляции и взаимосвязь таких факторов вирулентности *P. mirabilis* как роение, инвазия в эукариотические клетки, синтез гемолизина и уреазы (Liu et al., 2015; Kurihara et al., 2013; Jiang et al., 2010). Однако в литературе отсутствуют данные о влиянии мочевины на продуктивность протеиназы, а также о влиянии данного фермента на процесс инвазии бактерий.

Ранее была выделена и частично охарактеризована новая бактериальная металлопротеиназа ЕСР 32, специфически расщепляющая актин (Усманова, Хайтлина, 1989). В референтном штамме *Serratia grimesii* 30063 DZMO охарактеризована металлопротеиназа - гримелизин, идентичная протеиназе ЕСР32 (Божокина, 2008). Также обнаружен гомолог гримелизина, протеализин, синтезируемый *S. proteamaculans* (Demidyuk et al., 2006). Гены протеиназ клонированы и секвенированы, их последовательности зарегистрированы в Международной базе данных (гримелизин EU287452.1, протеализин AY819662.1). Соответствующие белки выделены и очищены из клеточного лизата, изучены их каталитические, физико-химические и энзиматические свойства (Demidyuk et al., 2006; Vozhokina et al., 2008). Установлена корреляция между протеолитической активностью продуцентов гримелизина/протеализина и их инвазией в эукариотические клетки (Божокина, 2008; Цапина, 2011). Показано, что некоторые условно-патогенные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* также обладают внутриклеточной металлопротеиназной активностью (Kothary et al., 2007; Kuan et al., 2011). Однако данные металлопротеиназы остаются малоизученными.

В связи с этим остается актуальным исследование инвазивной и протеолитической активности клинических изолятов *P. mirabilis* и *M. morganii*, представителей одной трибы *Proteeae*. Сравнительное изучение инвазивной и протеолитической активности уropатогенных штаммов близкородственных видов энтеробактерий важно для понимания особенностей патогенеза инфекции и выяснения вклада протеолитических ферментов в вирулентный потенциал возбудителей.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось исследование инвазивной и протеолитической активности условно-патогенных энтеробактерий *Proteus mirabilis* и *Morganella morganii*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Выявить инвазивную активность клинических изолятов *P. mirabilis* и *M. morganii* в отношении культуры эукариотических клеток HeLa и определить влияние основных факторов (возраст бактериальной культуры, инфицирующая доза и время инкубации) на эффективность инвазии.

2. Охарактеризовать особенности инвазии бактерий *P. mirabilis* и *M. morganii* с учетом морфологических изменений клеток HeLa.

3. Провести скрининг протеолитической активности клинических изолятов *P. mirabilis* и *M. morganii*, установить ее локализацию и закономерности биосинтеза внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis*.

4. Идентифицировать ген внутриклеточной металлопротеиназы *M. morganii* КТ с помощью биоинформационного анализа на базе референтной последовательности гена гримелизина с последующим определением аналога в геноме клинического изолята *M. morganii* ZM.

5. Выделить и очистить до гомогенного состояния функционально активный белок металлопротеиназы *M. morganii*.

Научная новизна. Впервые показано, что бактерии *M. morganii* ZM способны к инвазии в эукариотические клетки. Установлена корреляция между эффективностью инвазии и инфицирующей дозой бактерий, временем инкубации и возрастом бактериальной культуры. Получены новые знания о различиях во влиянии бактерий *M. morganii* и *P. mirabilis* на культуру эукариотических клеток. Установлено, что *P. mirabilis* и *M. morganii* - бактерии, относящиеся к трибе *Proteeae*, - различаются по протеолитической активности. Получены новые знания о влиянии мочевины на индукцию биосинтеза внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis*. В клиническом изоляте *M. morganii* выявлена и охарактеризована протеолитическая активность. Впервые в геноме *M. morganii* ZM нами идентифицирован ген гипотетической металлопротеиназы длиной 1104 п.о., транслированная аминокислотная последовательность которого всего на 37% идентична гримелизину *Serratia grimesii*. Установлено, что фермент относится к семейству М4 нейтральных пептидаз суперсемейства глущинкинов. Получен препарат высокоочищенной металлопротеиназы *M. morganii* ZM с молекулярной массой 35 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе зрелого продукта гипотетической металлопротеиназы *M. morganii*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Нуклеотидная последовательность гена гипотетической металлопротеиназы *M. morganii* может быть использована для создания рекомбинантных бактерий-продуцентов идентифицированного фермента. Полученный гомогенный препарат внутриклеточной протеиназы может быть использован для изучения структуры и функции металлопротеиназы как потенциального фактора патогенности. Выявление различий у близкородственных видов бактерий в способности инвазировать эукариотические клетки, а также определение особенностей биосинтеза металлопротеиназ *P. mirabilis* и *M. morganii* важно для поиска новых мишеней и разработки новых стратегий для терапии таких инфекций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способность бактерий *M. morganii* ZM и *P. mirabilis* 5127-1 к инвазии клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека М HeLa сопровождается у *P. mirabilis*, в отличие от *M. morganii*, выраженным цитотоксическим действием: нарушением монослоя культуры клеток, обусловленным внеклеточной протеолитической активностью бактерий.

2. Охарактеризована металлопротеиназа *P. mirabilis* 5127-1: она является секретлируемой, ее биосинтез повышается в присутствии мочевины в среде культивирования; фермент образует 2 изоформы, образование второй изоформы фермента зависит от состава среды культивирования.

3. *M. morganii* ZM обладает внутриклеточной металлопротеиназой, на 37% идентичной гримелизину. Фермент с молекулярной массой 35 кДа выделен в виде высокоочищенного препарата.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных высокоточных приборах; опубликованием полученных данных в отечественных журналах, с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на международных и региональных конференциях: Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ», МГУ, (Москва, 2010), XLIX Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск, 2011), Всероссийском симпозиуме с международным участием "Биологически активные вещества микроорганизмов - прошлое, настоящее, будущее" (Москва, 2011), 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2011, 2014, 2015), V международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины" (Ростов-на-Дону, 2013), Международном симпозиуме "Биохимия - основа наук о жизни" (Казань, 2013), Международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Казань, 2014), VII Всероссийской конференции "Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция" (Петрозаводск, 2014), VI Ежегодном всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014), Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2014).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров, а также, частично, за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Исследования выполнены при поддержке грантов: 13-04-97130 р_поволжье_а; Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: 2012-1.3.1-12-000-1002-015; Федеральной целевой программы № 14.А18.21.1118, № 14.А18.21.1516, № 14.А18.21.0857. Личный вклад автора заключается в разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации ее экспериментального решения, интерпретации полученных результатов.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 6 научных работ в реферируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Общая структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, включает 25 рисунков, 13 таблиц. Библиография включает 233 наименования.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н., доценту кафедры микробиологии А.М. Мардановой за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и обсуждение результатов; к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан и д.б.н., проф. М.Р. Шариповой за постоянные консультации и обсуждение полученных результатов; аспиранту, м.н.с. Л.Ф. Миннуллиной за помощь в секвенировании гена металлопротеиназы; к.б.н., с.н.с. Е.А. Науменко и аспиранту М.Р. Дзамуковой за культивирование эукариотических клеток в лаборатории Бионанотехнологий КФУ; к.б.н., н.с. А.А. Тойменцевой за идентификацию бактерий с помощью системы MALDI Biotyper; директору Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ Ю.Н. Осину за возможность проведения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии; к.б.н., н.с. Е.С. Божокиной за постоянную и неоценимую поддержку на всех этапах работы. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Используемые штаммы бактерий и клеточные линии

Штаммы *P. mirabilis* 5127-1 (№17) и *P. mirabilis* WV 10513 (№57) предоставлены д.б.н. Хайтлиной С.Ю. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и являются клиническими изолятами, полученными от урологических пациентов (Charite, Berlin).

В работе использовали клетки постоянной линии М HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН.

2. Питательные среды и условия культивирования

Культивирование штаммов проводили на среде LB (Sambrook et al., 1989). Мочевину в конечных концентрациях 4–600 мМ вносили в среду LB перед посевом в виде стерильных растворов. Агаризованная среда LBA включала дополнительно 2% агара.

«Искусственную» мочу готовили согласно (Jones et al., 2007) и стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. В качестве натуральной мочи использовали детскую объединенную мочу,

которую стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. Стерильность подтверждали высевом на LB.

Для культивирования клеток M HeLa использовали среду EMEM (Sigma), 10% FBS (Hyclone).

Культивирование бактерий проводили в колбах объемом 100 и 250 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1:5 на лабораторных качалках на вибростенде (B. Braun, Германия) с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 37°C. Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при длине волны 590 нм.

Клетки стабильной линии M HeLa культивировали на покровных стеклах или 6-луночных и 12-луночных планшетах (Nunc, Дания) до образования 80%-ого монослоя в течение 48 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде EMEM без антибиотиков с добавлением 10% FBS. Количество клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева.

3. Получение культуральной жидкости бактерий, клеточного лизата и актина

Клетки отделяли от культуральной жидкости с помощью центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 15 мин, культуральную жидкость замораживали и хранили при -20°C. Для получения клеточного лизата клетки дважды отмывали 0.8% NaCl, ресуспендировали в 0.05М Трис-HCl буфере, pH 7.3 и разрушали с помощью ультразвукового диспергатора УЗДИ-А (ООО Селми, Украина), центрифугировали в течение 20 мин при 20 000 об/мин (4°C). Лизат хранили при -20°C. Актин мышц кролика выделяли из ацетонового порошка, предоставленного д.б.н. Хайтлиной С.Ю. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), стандартным способом (Bozhokina et al., 2011).

4. Определение протеолитической активности

Определение специфической активности по расщеплению актина проводили по методу, описанному в работе (Khaitlina, 1991). Расщепление актина анализировали методом SDS-ПААГ-электрофореза (Laemmli, 1970). **Гидролиз желатина** исследовали методом зимографии (Oliver et al., 1999). **Определение протеолитической активности по гидролизу азоказеина** проводили по методу, описанному в работе (Wassif et al., 1995).

Для определения влияния ингибиторов на активность протеиназ использовали *o*-фенаantroлин и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma, США). Клеточный лизат инкубировали с 5 мМ *o*-фенаantroлина или 2 мМ PMSF в течение 1 ч при 37°C, после чего определяли остаточную активность по гидролизу актина и азоказеина. Продуктивность выражали в условных единицах (Активность/Рост).

5. Выделение внутриклеточной протеиназы *M. morganii*

Выделение фермента из клеточного лизата *M. morganii* ZM проводили с помощью сульфатаммонийного фракционирования с интервалом насыщения 0-20%, 20-50% и 50-70% и гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе (Pharmacia, США). Фенилсефарозу уравнивали 0.05 М Трис-HCl буфером,

pH 7.3, 5 mM Ca^{2+} , содержащим 35% сульфата аммония. Белок элюировали тем же буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 10–15%.

6. Выделение ДНК и полимеразная цепная реакция

Выделение геномной ДНК. Выделение геномной ДНК из клеток *M. morganii* ZM проводили с использованием коммерческого набора GeneJet™ DNA Purification Kit (Fermentas) согласно протоколу производителя.

Выделение ДНК из агарозного геля. Для экстракции ДНК из агарозного геля использовали набор GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas).

Полимеразную цепную реакцию для амплификации нуклеотидных последовательностей геномной ДНК или генов 16S рРНК проводили по методу, описанному в работе (Mullis, Faloona, 1987). Реакцию ПЦР-амплификации проводили в термоциклере BioRad MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler.

7. Биоинформационный анализ

Для биоинформационного поиска и анализа использовали программы BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE), MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), MEGA 4 и BioEdit (v. 7.0.0), базы данных ASAP (https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/sim_search_query.php?) и Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Анализ промоторной области проводили с использованием программы BPRM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>).

8. Гентамициновый метод определения бактериальной инвазии эукариотических клеток

Для количественной оценки эффективности инвазии использовали гентамициновый метод, описанный в работе (Bozhokina et al., 2015). Клеточные линии HeLa выращивали в среде EMEM, 10% FBS в течение 48 ч на 6-ти луночных планшетах. За 100% КОЕ внутриклеточных бактерий принимали наибольшее число КОЕ.

Жизнеспособность клеток HeLa определяли по исключению красителя трипанового синего по методу, описанному в работе (Шамов с соавт., 2012).

9. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Лазерную сканирующую конфокальную микроскопию проводили на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ИФМиБ, КФУ. Клетки HeLa выращивали в течение 2 суток на покровных стеклах и инкубировали с бактериями. Актиновый цитоскелет окрашивали родамин-фаллоидином (Sigma). ДНК эукариотических и бактериальных клеток окрашивали DAPI (Sigma). Голубую флуоресценцию (DAPI) возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, красную (родамин-фаллоидин) – He-Ne лазером с длиной волны 543 нм. Срезы в плоскости X0Z были получены с приращением примерно 0.2 мкм.

10. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с использованием стандартного пакета *Microsoft Office Excel* путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma < 10\%$. В качестве критерия достоверности

получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P < 0.05$ за достоверный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Эффективность инвазии бактерий *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM клеток М HeLa

Мы идентифицировали до вида клинические изоляты № 17 и № 57 от урологических больных. Изолят №17 отнесен к виду *P. mirabilis*, а изолят №57 – к *M. morganii*. В дальнейшей работе изоляту №57 было присвоено имя *M. morganii* ZM, а изоляту №17 - *P. mirabilis* 5127-1.

Исследовали влияние бактерий *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM на жизнеспособность клеток М HeLa и их адгезию с помощью окраски клеток трипановым синим. Как видно из Рисунка 1, два вида энтеробактерий оказывали различное влияние на клеточную культуру. Так, при инкубации клеток HeLa с бактериальной культурой *M. morganii* в течение 2 ч не наблюдали значительного изменения в монослое клеток. Отсутствовал цитотоксический эффект, проявляющийся в виде открепления клеток от субстрата (Рисунок 1 Б). Увеличение количества бактериальных клеток с 1:10 до 1:100 не оказывало видимого эффекта. В отличие от *M. morganii*, бактерии *P. mirabilis* оказывали цитотоксическое действие на клетки HeLa. Наблюдали уменьшение количества клеток в монослое, вызванное откреплением клеток. Эффект зависел от соотношения HeLa к бактериям. Так, при соотношении равном 1:10 и 1:50 плотность клеток в монослое уменьшалась на 5 и 20% соответственно, а при соотношении 1:100 – более чем на 80% по сравнению с контролем (Рисунок 1 А). При этом жизнеспособность клеток HeLa в случае инкубирования с *P. mirabilis* и *M. morganii* составляла 91 и 94% соответственно.

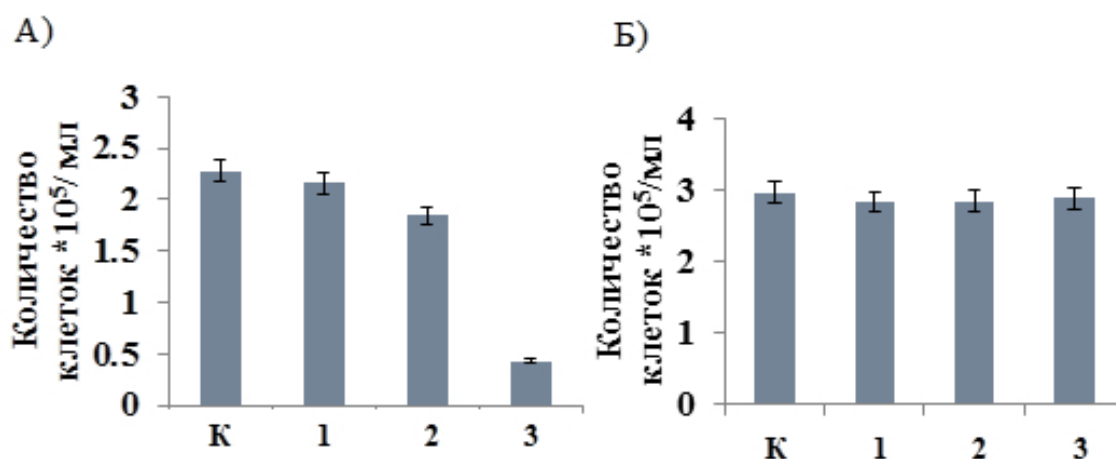


Рисунок 1. Количество клеток М HeLa в монослое через 2 ч инкубации культуры клеток с бактериями *P. mirabilis* 5127-1 (А) и *M. morganii* ZM (Б). 1-3 – соотношение клеток HeLa к бактериям 1:10, 1:50 и 1:100 соответственно. К – количество клеток HeLa без бактерий.

Эффективность инвазии оценивали по количеству внутриклеточных бактерий с помощью гентамицинового метода. Исследовали зависимость инвазии *P. mirabilis* и *M. morganii* от соотношения эукариотических клеток к бактериальным и времени инкубации. Установили, что инвазия обоих штаммов энтеробактерий зависела от инфицирующей дозы и времени инкубации (Рисунок 2). При соотношении клеток HeLa и *P. mirabilis* 1:10, количество КОЕ на 1 мл лизата клеток (≈ 400 -600 клеток) составляло 60 при инкубации клеток в течение 1 ч и 375 при инкубации клеток в течение 2 ч. При увеличении инфицирующей дозы до 1:50 количество КОЕ увеличивалось до 123 и 409 для 1 и 2 ч инкубации клеток соответственно. Однако при дальнейшем повышении инфицирующей дозы (1:100) наблюдали уменьшение эффективности инвазии – снижение КОЕ в лизате до 90 и 351 КОЕ для 1 и 2 ч инкубации клеток соответственно. Таким образом, оптимальным для эффективной инвазии штамма *P. mirabilis* 5127-1 оказалось соотношение эукариотических клеток к бактериям 1:50 и время инкубации 2 ч (Рисунок 2 А).

В случае инвазии *M. morganii*, при соотношении клеток 1:10, количество КОЕ внутриклеточных бактерий составляло 275 (время инкубации клеток 2 ч) и 380 (время инкубации клеток 4 ч). При повышении инфицирующей дозы до 1:50 количество КОЕ увеличивалось до 370 и 593 для 2 и 4 ч инкубации клеток соответственно. Оптимальным для эффективной инвазии оказалось соотношение эукариотических клеток к бактериям 1:100 и время инкубации 4 ч. В данных условиях количество КОЕ было максимальным и достигало 1190 на мл лизата (Рисунок 2 Б).

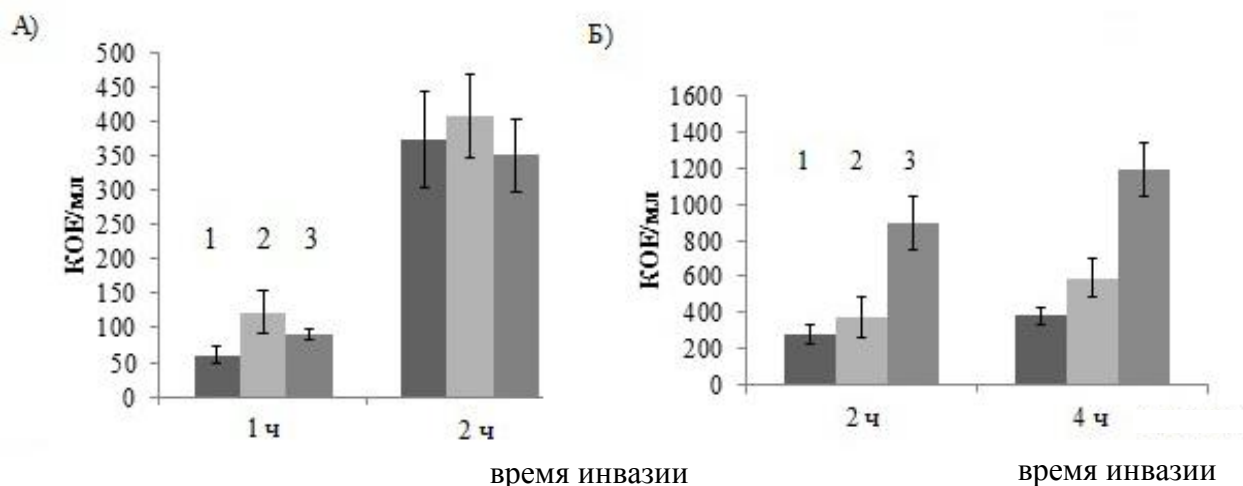


Рисунок 2. Количество внутриклеточных бактерий *P. mirabilis* (А) и *M. morganii* (Б) в зависимости от времени инвазии и инфицирующей дозы. Соотношение HeLa к бактериям: 1 – 1:10, 2 – 1:50, 3 – 1:100.

Сравнение эффективности инвазии двух штаммов энтеробактерий показало, что при соотношении клеток HeLa к бактериям, равном 1:10, штамм *P. mirabilis* инвазировал эффективнее штамма *M. morganii* (2 ч инкубации).

Однако при увеличении инфицирующей дозы (соотношение клеток 1:100), эффективность инвазии повышалась только для культуры *M. morganii*.

Исследовали эффективность инвазии *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM в зависимости от стадии роста бактериальной культуры. Использовали клетки бактерий, находящиеся в экспоненциальной фазе роста (12 ч), стационарной фазе (24 ч) и стадии отмирания культуры (48 ч). Эффективность инвазии рассчитывали по количеству проникающих в эукариотические клетки бактерий. В случае обоих бактериальных штаммов, эффективнее инвазировали клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста (12 ч).

Для выяснения влияния экзогенных метаболитов бактерий исследовали влияние культуральной жидкости на целостность монослоя клеточной культуры. Использовали культуральную жидкость после 12 ч роста *P. mirabilis* и *M. morganii*. Как видно из Рисунка 3, при внесении культуральной жидкости происходило увеличение количества «свободных» клеток в среде в случае обеих культур. Однако культуральная жидкость *P. mirabilis* способствовала откреплению клеток значительно сильнее, чем культуральная жидкость *M. morganii*. Так, культуральная жидкость *P. mirabilis*, разведенная в 3 и 6 раз, способствовала увеличению количества открепившихся клеток в 2.4 и 2.7 раз соответственно по сравнению с контролем. В тех же условиях количество открепившихся клеток после инкубации с культуральной жидкостью *M. morganii* увеличивалось не более чем в 1.4 раза относительно контроля. Инактивация культуральной жидкости обеих бактерий обработкой 60°C приводила к прекращению открепления клеток. В обоих случаях при обработке культуры клеток инаktivированной культуральной жидкостью количество открепившихся клеток было близко к контролю.

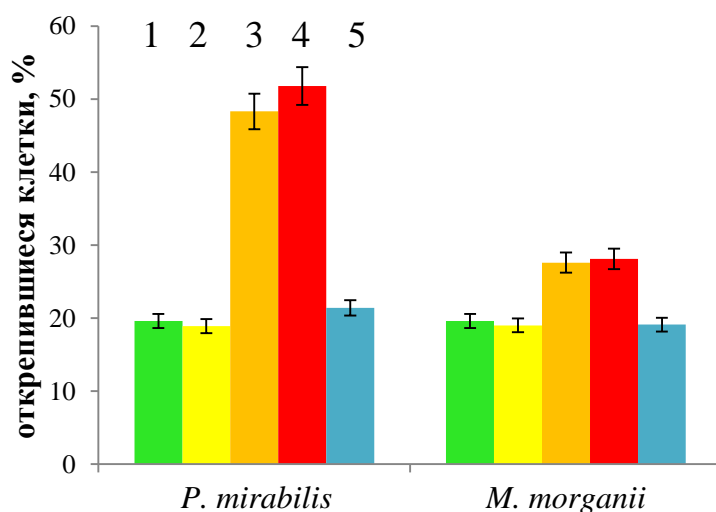


Рисунок 3. Деструкция монослоя клеточной линии М HeLa в присутствии культуральной жидкости *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Соотношение ростовой среды ЕМЕМ и культуральной жидкости: 1 – ЕМЕМ без КЖ, 2 – 15:1, 3 – 6:1, 4 – 3:1, 5 – ЕМЕМ + инаktivированная КЖ 6:1. 100% - общее количество клеток.

Таким образом, в культуральной жидкости *P. mirabilis* присутствовал фактор (или факторы), способствующий разрушению монослоя клеточной культуры и откреплению клеток от субстрата. Этот фактор разрушался под действием высокой температуры и присутствовал в незначительных количествах у *M. morganii*.

2. Сравнительная характеристика инвазивной активности энтеробактерий по данным конфокальной микроскопии

Для подтверждения инвазии бактерий и характеристики изменения морфологии эукариотических клеток использовали лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. Для этого клетки HeLa инкубировали с бактериями *P. mirabilis* 5127-1 в течение 2 ч, а с *M. morganii* ZM - 4 ч. В качестве контроля использовали клетки HeLa без бактерий.

На Рисунке 4 представлены результаты конфокальной микроскопии клеток М HeLa после инкубации с бактериями *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Как видно из фотографий, бактериальные клетки в большом количестве обнаруживались в межклеточном пространстве, на поверхности клеток в прикрепленном состоянии, а также в цитоплазме эукариотических клеток (Рисунок 4 - 3), что свидетельствовало о способности бактерий к адгезии и инвазии. Морфология эукариотических клеток при этом изменялась: наблюдалась значительная реорганизация актинового цитоскелета клеток (Рисунок 4 - 4), разрыхление клеточного монослоя, появление множества протрузий. При инвазии *P. mirabilis*, инкубация с бактериями приводила к значительному разрушению клеточного монослоя (Рисунок 4 - 5). У клинического изолята *P. mirabilis* адгезивные свойства были выше, чем у *M. morganii* ZM. Отметим изменение формы клеток HeLa под воздействием *P. mirabilis* (Рисунок 4 - 6).

Таким образом, установлено, что бактериальные штаммы *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM способны интенсивно инвазировать эукариотические клетки. Эффективность инвазии при этом зависела от возраста бактериальной культуры, времени инкубации, а также от количественного соотношения бактериальных и эукариотических клеток. При этом бактерии *P. mirabilis* вызывали разрушение монослоя HeLa.

3. Исследование протеолитической активности штаммов *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM

3.1 Определение внеклеточной и внутриклеточной протеолитической активности штаммов

Для определения наличия внеклеточных протеолитических ферментов, расщепляющих казеин, бактерии культивировали на среде с казеином. Показали, что внеклеточную протеолитическую активность в отношении казеина проявлял только штамм *P. mirabilis* 5127-1. Вокруг колоний штамма *M. morganii* ZM не обнаружили зоны просветления среды.

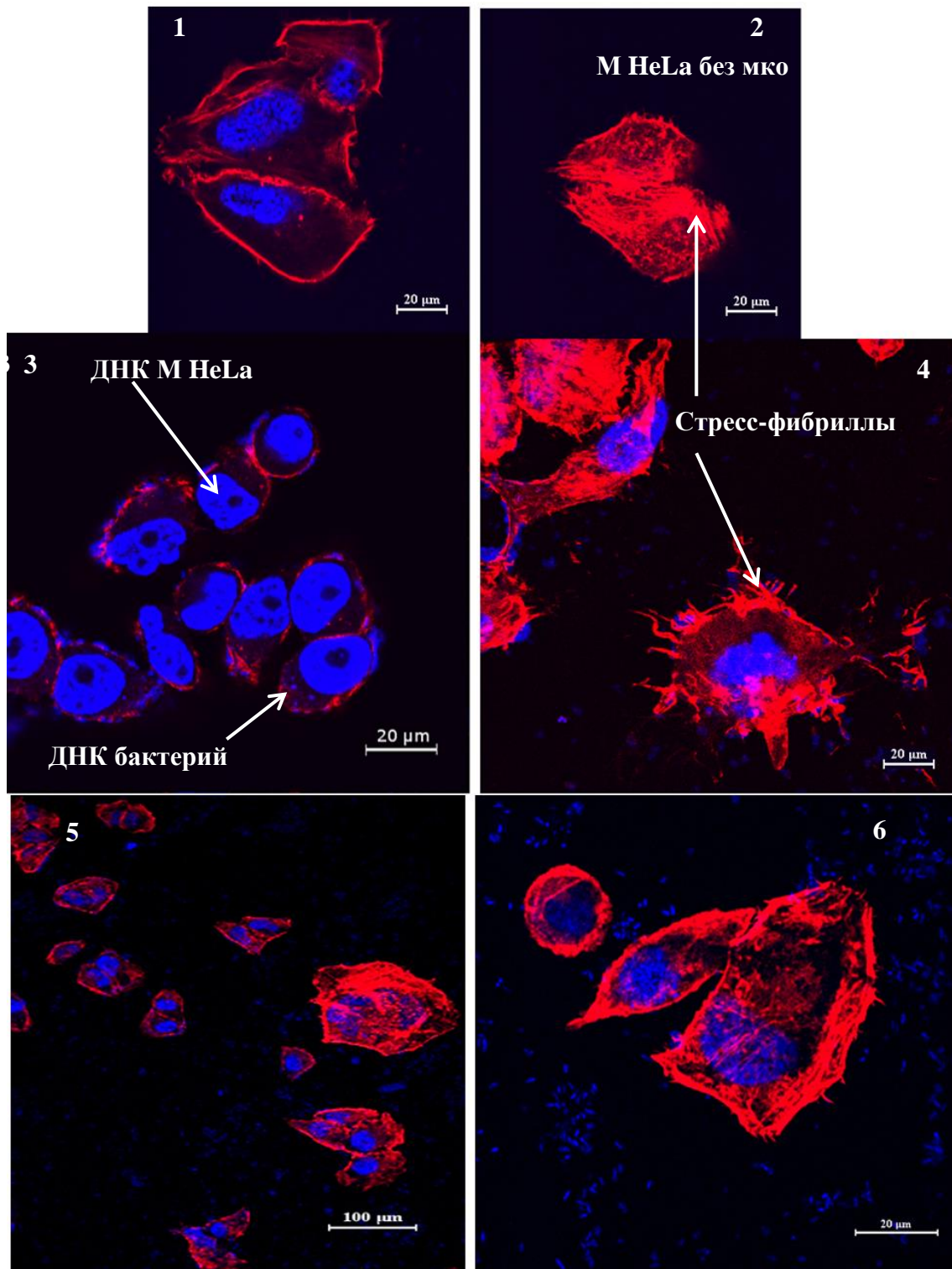


Рисунок 4. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия эукариотических клеток линии М HeLa после инкубации с *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Актиновый цитоскелет окрашен родамин-фаллоидином (красный). ДНК клеток и бактерий окрашены DAPI (голубой). 1, 2 – клетки линии М HeLa (контроль). 3, 4 – клетки линии М HeLa с инвазировавшими и адгезированными бактериями *M. morganii* ZM. 5, 6 – клетки линии М HeLa с инвазировавшими и адгезированными бактериями *P. mirabilis* 5127-1. Стресс-фибриллы эукариотических клеток, ДНК эукариотических клеток, ДНК бактериальных клеток отмечены стрелками.

Исследовали внутриклеточную протеолитическую активность в клеточных лизатах энтеробактерий с использованием азоказеина на 24 и 48 ч роста культур. Внутриклеточная протеолитическая активность на 24 ч роста у обоих штаммов была незначительной. На 48 ч роста в клетках штамма *P. mirabilis* активность по отношению к азоказеину проявлялась на низком уровне, в то время как в клетках штамма *M. morganii* эта активность была выше в 4-4.5 раз.

Расщепление желатина исследовали методом зимографии. Исследование клеточных лизатов энтеробактерий на 24 ч культивирования не выявило ферментов, ассоциированных с клетками и способных расщеплять желатин. Однако в клетках на 48 ч культивирования обнаружена внутриклеточная активность (Рисунок 5). Так же, как и в случае с азоказеином, наибольшую активность проявил штамм *M. morganii* ZM. В лизате обнаружено несколько зон, обладающих высокой активностью по гидролизу желатина (в области молекулярных масс ≈ 45 -30 кДа, а также в высокомолекулярной области).

Клеточный лизат *M. morganii* проявлял широкую специфичность по гидролизу актина, расщепляя его неограниченно. Клеточный лизат не терял способность к расщеплению актина даже в случае разведения в 8 раз. Протеолитическая активность в клеточном лизате *M. morganii* ингибировалась *o*-фенантролином на 70% и не менялась в присутствии PMSF – ингибитора сериновых протеиназ.

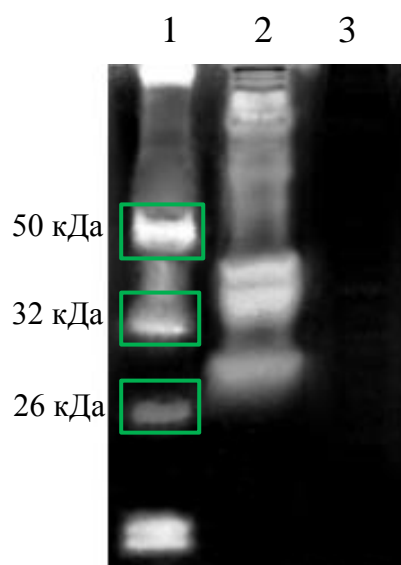


Рисунок 5. Зимограмма клеточных лизатов энтеробактерий на 48 ч культивирования. 1 – протеиназы, выделенные рамкой: серрализин *S. marcescens* SM6 (50 кДа), субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* 7P (32 кДа), глутамилэндопептидаза *B. pumilus* 7P (26 кДа), 3 - *M. morganii* ZM, 4 - *P. mirabilis* 5127-1. Субстрат – желатин.

Таким образом, виды бактерий, относящиеся к трибе *Proteeae*, различаются по протеолитической активности. Только штамм *P. mirabilis* проявлял высокую внеклеточную протеолитическую активность. В то же время внутриклеточная активность обнаружена в бактериях *M. morganii* при использовании в качестве субстратов азоказеина, актина и желатина.

3.2 Особенности биосинтеза внеклеточной протеиназы *P. mirabilis* 5127-1

Для исследования протеиназы *P. mirabilis* 5127-1 использовали азоказеин и желатин. Протеиназа выделялась в среду после 4 ч роста бактерий и продолжала секретироваться на всех этапах развития культуры, достигнув максимума в стационарной фазе роста бактерий. Внеклеточная протеолитическая активность полностью ингибировалась 10 мМ *o*-фенантролином, ингибитором металлопротеиназ, и была нечувствительна к 2 мМ PMSF, ингибитору сериновых протеиназ. На основании данных по ингибированию фермента можно сделать вывод, что протеиназа является металлоэндопептидазой.

Показано, что в культуральной жидкости разных штаммов *P. mirabilis* присутствует две изоформы металлопротеиназы с молекулярными массами 52 кДа и 50 кДа (Senior, 1999; Pearson et al., 2008). Зимография белков культуральной жидкости позволила выявить изоформы внеклеточной протеиназы *P. mirabilis*. Исследовали динамику появления изоформ на разных часах роста (среда LB) методом зимографии (Рисунок 6). Через 6 ч роста культуры внеклеточная протеолитическая активность была низкой, и в культуральной жидкости наблюдали только одну изоформу фермента с Mr = 52 кДа; после 12 ч протеолитическая активность повышалась, и появлялась изоформа с Mr = 50 кДа. Активность изоформы с Mr = 50 кДа была незначительной. После 18 ч роста обнаруживались обе изоформы фермента, активность которых сохранялась и после 20–24 ч. Сканирование гелей показало, что изоформа с Mr = 52 кДа более выражена по сравнению с изоформой с Mr = 50 кДа.

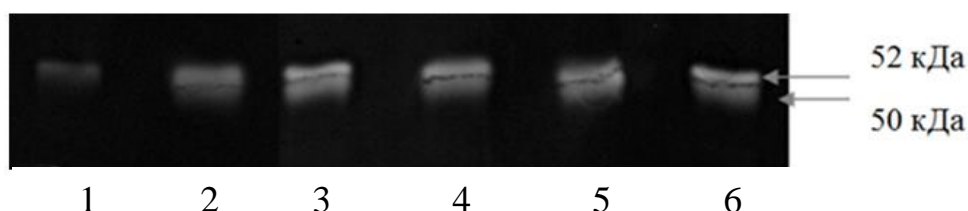


Рисунок 6. Зимограмма супернатанта культуральной жидкости *P. mirabilis* при росте на среде LB при 37°C. 1 – 6 ч, 2 – 12 ч, 3 – 18 ч, 4 – 20 ч, 5 – 22 ч, 6 – 24 ч. Субстрат – желатин.

Исследовали накопление внеклеточной протеиназы в присутствии в среде мочевины. В норме содержание мочевины в моче у взрослого человека достигает 400–700 мМ (Liu et al., 2012). Мы исследовали влияние мочевины (10–600 мМ) на рост штамма и активность металлопротеиназы при культивировании *P. mirabilis* в течение 16 ч. Мочевина в концентрации 50–100 мМ приводила к резкому ингибированию роста культуры (на 50–70% от контроля) (Рисунок 7 А). В присутствии 300 и 600 мМ мочевины оптическая плотность культуры не превышала 15–20% контрольной. В этих условиях продуктивность культуры по синтезу внеклеточной протеиназы увеличивалась в 2.5–3.0 раза (Рисунок 7 Б).

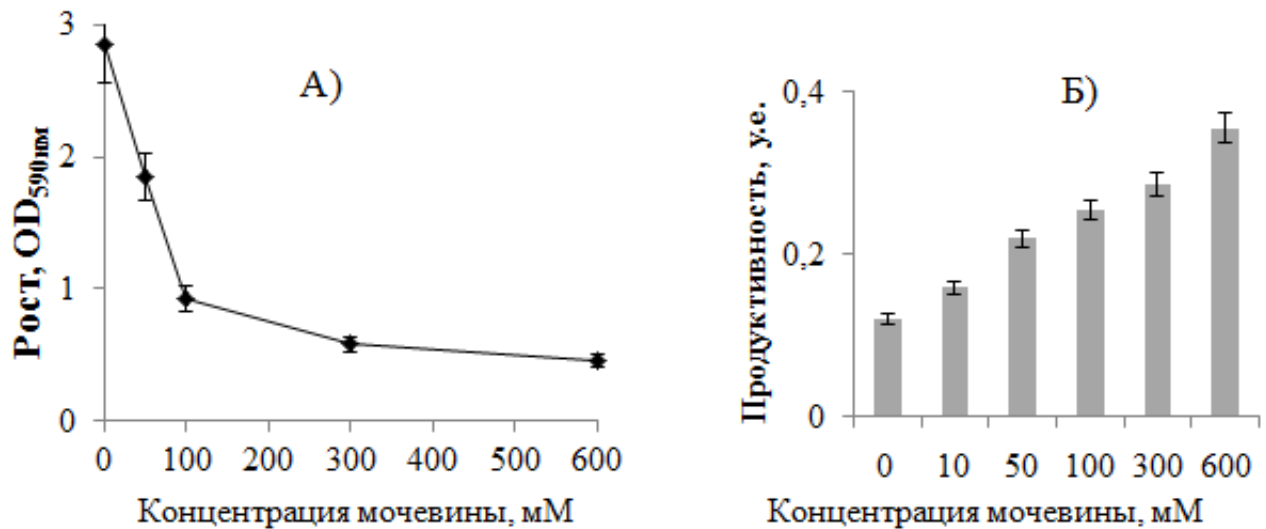


Рисунок 7. Рост бактерий *P. mirabilis* (А) и продуктивность биосинтеза внеклеточной протеиназы (Б) в присутствии в среде мочевины. Бактерии культивировали 16 ч при 37°C на среде LB, содержащей 0–600 мМ мочевины.

Исследовали накопление внеклеточной протеиназы *P. mirabilis* при росте культуры на «искусственной» и натуральной моче по сравнению с таковыми на среде LB с 50 мМ мочевиной и без мочевины (Рисунок 8). Максимальный рост бактерий наблюдали на средах LB и LB с 50 мМ мочевины. На «искусственной» и натуральной моче рост составлял 20–30% роста на среде LB (Рисунок 8 А). На контрольной среде (среда LB) наблюдали низкую продуктивность культуры по внеклеточной протеиназе. В присутствии в среде 50 мМ мочевины продуктивность культуры повышалась на 60–65%. Продуктивность культуры относительно синтеза протеиназы на «искусственной» и натуральной моче была выше в 2–2.5 и 3 раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 8 Б).

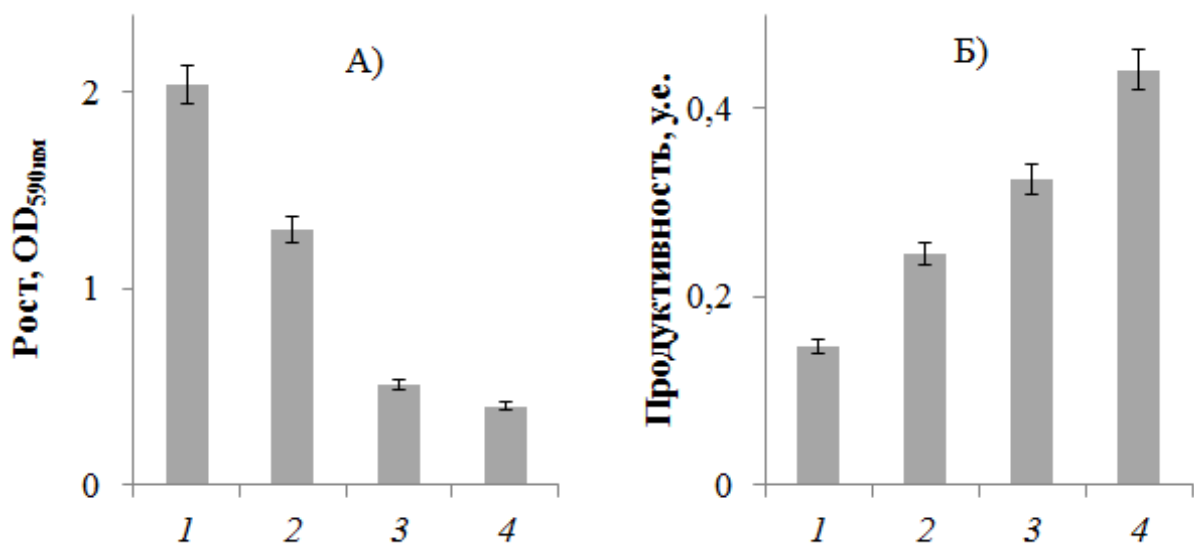


Рисунок 8. Рост *P. mirabilis* (А) и продуктивность культуры по биосинтезу протеиназы (Б) на разных средах на 16 ч роста. 1 – среда LB, 2 – среда LB + 50 мМ мочевины, 3 – «искусственная» моча, 4 – натуральная моча.

Исследовали образование изоформ протеиназы при росте бактерий на «искусственной» моче (Рисунок 9). По данным зимографии активность появлялась в среде после 12 ч роста и достигала максимума после 48 ч. По сравнению с этим при росте *P. mirabilis* на среде LB протеолитическая активность обнаруживалась после 4 ч роста бактерий и достигала максимума после 16 ч. роста. Важное отличие заключалось в том, что при росте бактерий на «искусственной» моче мы идентифицировали одну изоформу металлопротеиназы.

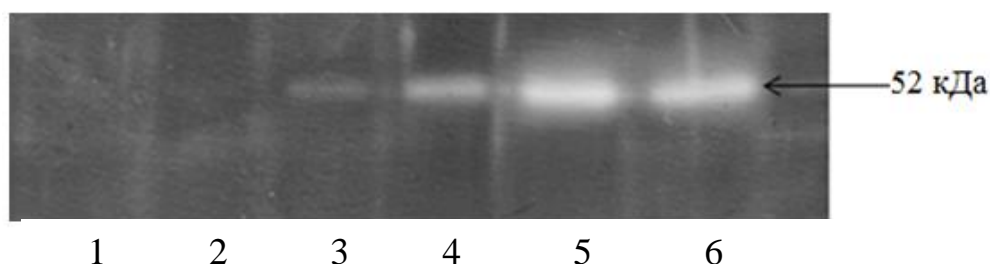


Рисунок 9. Зимограмма супернатанта культуральной жидкости *P. mirabilis* при росте бактерий на «искусственной» моче. 1 – 4 ч, 2 – 8 ч, 3 – 12 ч, 4 – 24 ч, 5 – 48 ч, 6 – 72 ч. Субстрат – желатин.

Таким образом, нами исследован биосинтез металлопротеиназы штаммом *P. mirabilis* 5127-1 на разных средах и влияние на биосинтез фермента мочевины. Нами установлено, что максимальная продуктивность культуры относительно синтеза протеиназы достигается на среде с натуральной мочой. Добавление в среду LB мочевины приводило к увеличению продуктивности культуры относительно синтеза протеиназы. В отличие от среды LB при росте бактерий на «искусственной» моче протеиназа появлялась в среде после 12 ч роста в виде одной изоформы.

4. Биоинформационный анализ генов металлопротеиназ и их гомологов в геномах аннотированных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

4.1 Поиск генов гомологов внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis*

Нами проведен биоинформационный анализ секвенированных бактериальных геномов энтеробактерий с целью поиска генов-гомологов внеклеточной ZapA протеиназы *P. mirabilis*. В геномах разных родов энтеробактерий (*Serratia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Yersinia* и др.) мы обнаружили гены, продукты которых гомологичны протеиназе ZapA. Однако степень гомологии генов невысока. Так при длине гена *zapA* в 1476 п.о. (белок 491 аминокислот), в геноме *S. proteamaculans* обнаружен участок с 67% гомологии в пределах всего 563 п.о. При этом идентичность белков составляет 51%. Часть обнаруженных гомологов ZapA *P. mirabilis* аннотированы как серрализины или серрализиноподобные протеиназы. Многие из обнаруженных белков не изучены и аннотированы как гипотетические металлопротеиназы.

Также в геноме аннотированного штамма *M. morganii* SC01 AMWL02000001.1, секвенированного в 2013 году Khatri с соавторами, обнаружена нуклеотидная последовательность, кодирующая гипотетическую секретлируемую щелочную металлопротеиназу EMP53683.1, с участком гомологии 75% в пределах 65 п.о. При этом идентичность белков составляет 54%. Однако мы не обнаружили внеклеточную протеолитическую активность у *M. morganii* ZM, что говорит о полном отсутствии или низком уровне секреции аннотированной протеиназы.

Анализ геномных локусов, несущих гены-гомологи внеклеточной протеиназы ZapA, выявил высокое сходство у близкородственных штаммов и видов энтеробактерий. Однако локус, несущий гомолог этого гена, в геноме *M. morganii* KT значительно отличался как по составу генов, так и по дизайну.

4.2 Поиск внутриклеточной металлопротеиназы в геноме аннотированного штамма *M. morganii* subsp. *morganii* KT и его ортологов в геномах энтеробактерий

Проводили поиск генов, кодирующих внутриклеточные протеиназы, в геномах *M. morganii* subsp. *morganii* KT и *P. mirabilis* HI4320, используя референтную последовательность хорошо охарактеризованной протеиназы – гримелизина *S. grimesii* A2, представителя семейства *Enterobacteriaceae*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/163716943>) с помощью программы BLASTX. В геноме *P. mirabilis* не выявили последовательности, кодирующей подобную внутриклеточную протеиназу. В геноме аннотированного штамма *M. morganii* KT (gb|CP004345|) обнаружен ген гипотетической металлопротеиназы (AN CP004345.1) длиной 1101 п.о. Обнаруженный гипотетический белок состоял из 366 аминокислот и относился к семейству M4 нейтральных пептидаз суперсемейства глутинкинов. Молекулярная масса белка (с пропептидом) составила 41,7 кДа. Молекулярная масса гримелизина *S. grimesii* A2 – 32 кДа (Bozhokina et al., 2008). Гипотетическая металлопротеиназа *M. morganii* KT идентична гримелизину *S. grimesii* A2 по аминокислотной последовательности всего на 37%, что свидетельствует о значительных различиях в первичной структуре белков.

Идентифицированная последовательность гена *M. morganii* KT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/455418716?report=genbank&from=1950949&to=1952049>) была использована для биоинформационного поиска генов-ортологов с помощью программы BLASTN. Показано, что в геномах различных видов семейства *Enterobacteriaceae* присутствуют гомологичные последовательности. Однако их протяженность невелика и не превышает 204 п.о. у *Enterobacter sakazakii* (гомология 68%), 191 п.о. у *Klebsiella oxytoca* E718 (68% гомологии) и 167 п.о. у *Pantoea* sp. At-9b (70% гомологии) при длине ОРС 1101 п.о. BLASTP-анализ гипотетической аминокислотной последовательности белка выявил наличие большого числа его гомологов среди белков бактерий сем. *Enterobacteriaceae*. Наиболее близкими гомологами являются эластаза *S. marcescens* FGI94, протеализин *S. proteamaculans* 568 и внеклеточная металлопротеиназа растительного патогена *D. dadantii* 3937.

Таким образом, в геноме *M. morganii* КТ обнаружили ген гипотетической металлопротеиназы с невысокой гомологией к внутриклеточным протеиназам некоторых энтеробактерий, таким как эластаза *S. marcescens*, протеализин *S. proteamaculans*, гримелизин *S. grimesii* и др. Идентифицированный белок *M. morganii* имеет невысокую идентичность с перечисленными белками (идентичность не превышает 39%), в настоящее время не выделен и не изучен.

Геномный локус, несущий ген гипотетической внутриклеточной металлопротеиназы *M. morganii*, не имеет сходства с локусом гена протеализина *S. proteamaculans*.

5. Идентификация и анализ гена гипотетической металлопротеиназы в геноме штамма *M. morganii* ZM

Основываясь на данных биоинформационного анализа гена *M. morganii* КТ, были сконструированы праймеры для амплификации гомологичного гена в геноме изолята *M. morganii* ZM. Полученные с помощью праймеров продукты ПЦР-амплификации были секвенированы, сиквенсы выравнены с помощью программы MEGA 4, что позволило установить последовательность всего гена с регуляторной областью.

После множественного выравнивания секвенированных ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью этих праймеров, была выявлена ОРС длиной в 1104 п.о. Секвенированный участок генома *M. morganii* ZM, содержащий ген металлопротеиназы, был занесен в базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank под идентификационным номером KJ649438 (Рисунок 10).



Рисунок 10. Нуклеотидная последовательность регуляторной и структурной области гена металлопротеиназы *M. morganii* ZM. Цветом выделены старт- и стоп-кодоны. TGA – стоп-кодон предыдущего гена, rpoD17 – сайт связывания σ -фактора, ср – сайт связывания CAP-белка, SD – последовательность Шайна-Дальгарно.

С помощью программы BPRON проводили поиск консервативных последовательностей «-10» и «-35» и сайтов связывания транскрипционных

факторов (Рисунок 11). В регуляторной области гена *M. morganii* ZM нами обнаружен сайт связывания σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы, идентифицирована последовательность Шайна-Дальгарно и последовательность, обладающая частичной гомологией с последовательностью сайта связывания CAP-белка (TGTGAN₆TCACA). Как известно, CAP-белок участвует в регуляции экспрессии генов по механизму углеродной катаболитной репрессии (Leuze et al., 2012). Можно предположить, что в регуляции экспрессии гена металлопротеиназы *M. morganii* также задействован этот механизм.

Провели сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей металлопротеиназ *M. morganii* ZM и *M. morganii* KT с использованием программ BLASTN и BLASTP. По результатам анализа было выявлено, что ген *M. morganii* ZM гомологичен гену *M. morganii* KT на 83%. Степень идентичности аминокислотных последовательностей составила 86% при сходстве 92% (Рисунок 11).

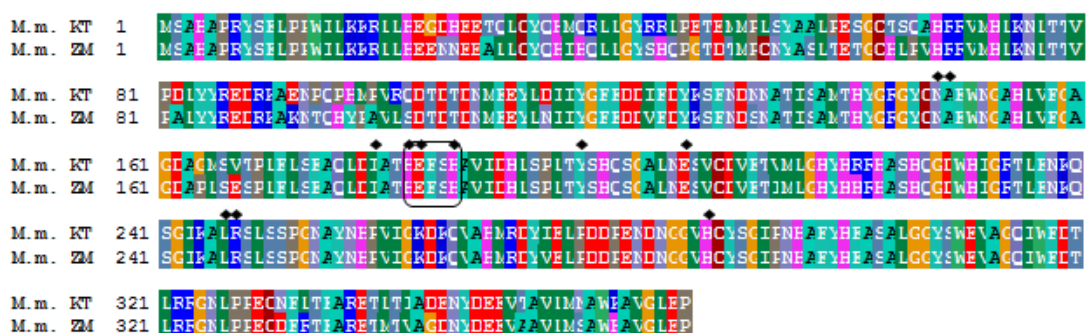


Рисунок 11. Выравнивание аминокислотных последовательностей металлопротеиназ *M. morganii* ZM и *M. morganii* KT. Zn-связывающий мотив выделен рамкой. ♦ – аминокислотные остатки активного центра.

Несмотря на сравнительно невысокую (для представителей одного вида) степень идентичности, аминокислотные замены в активном центре и сайте связывания цинка у изучаемых белков не обнаружены.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков-гомологов с последовательностью металлопротеиназы (YP_007505137.1) *M. morganii* KT (Рисунок 12) показало, что в последовательности *M. morganii* KT присутствуют вставки, отсутствующие у других металлопротеиназ. В последовательности гипотетической металлопротеиназы выявили консервативный мотив HEXXH, входящий в сайт связывания Zn. Однако состав аминокислот в позиции XX у металлопротеиназы *M. morganii* KT отличается. XX аминокислотные остатки представлены фенилаланином (F) и серином (S), в то время как в геномах *Serratia* это - лейцин (L) и аланин (A), а в металлопротеиназе *D. dadantii* 3937 – лейцин и серин.

Таким образом, с помощью праймеров, сконструированных к последовательности гена *M. morganii* KT, идентифицирован ген

металлопротеиназы в геноме изолята *M. morganii* ZM, гомологичный гену *M. morganii* КТ на 83%.

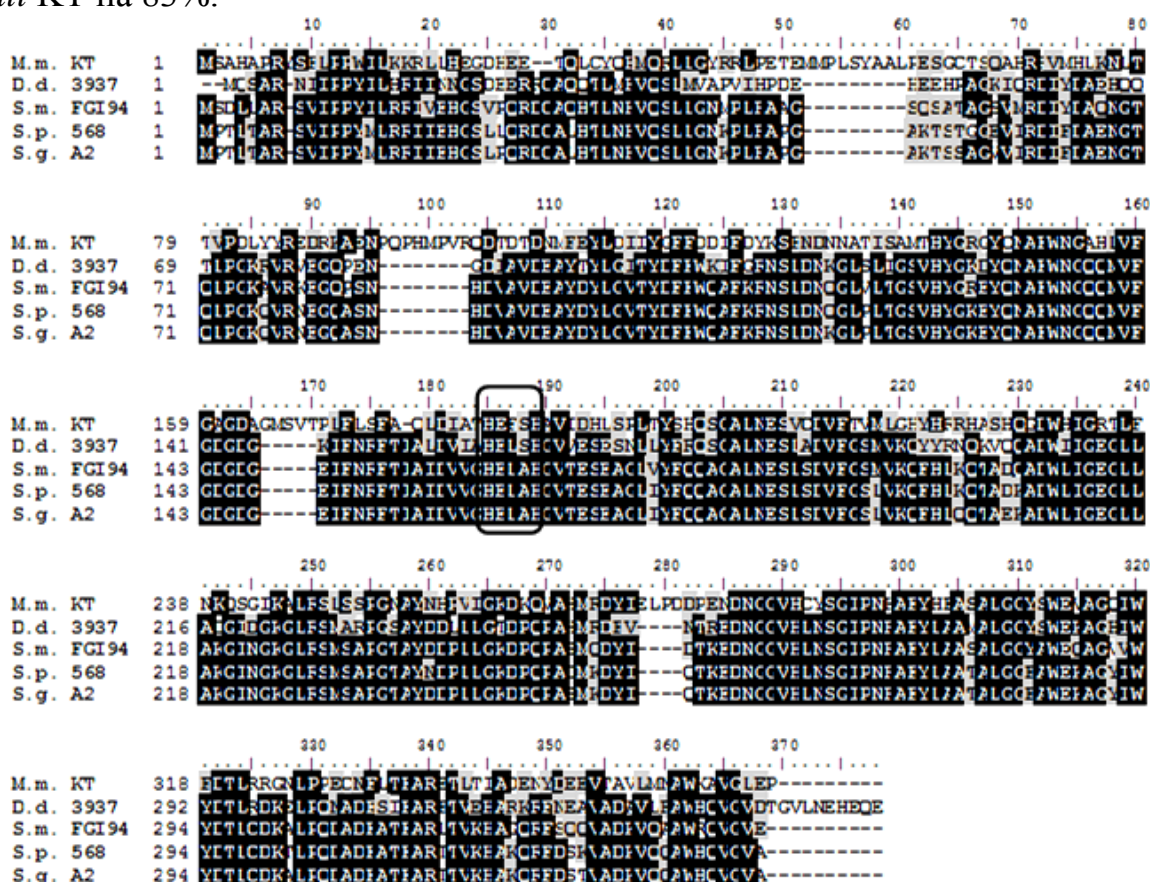


Рисунок 12. Выравнивание аминокислотной последовательности YP_007505137.1 *M. morganii* КТ относительно последовательностей металлопротеиназ бактерий сем. *Enterobacteriaceae*. *M.m.* КТ – *M. morganii* КТ; *S.m.* FGI94 – *S. marcescens* FGI94; *D.d.* 3937 – *D. dadantii* 3937; *S.p.* 568 – *S. proteamaculans* 568; *S.g.* A2 – *S. grimesii* A2. Консервативный цинксвязывающий мотив HEXXH выделен рамкой.

6. Выделение внутриклеточной металлопротеиназы *M. morganii* ZM

Для выделения металлопротеиназы из клеточного лизата *M. morganii* ZM использовали сульфатаммонийное фракционирование. В полученных фракциях определяли активность с помощью метода зимографии (Рисунок 13). Максимальную активность обнаружили во фракции, соответствующей 20-50% насыщения сульфатом аммония, которую после диализа использовали для гидрофобной хроматографии на колонке с фенилсефарозой (Рисунок 14). На Рисунке 13 (3) представлена зимограмма фракции с активностью, чувствительной к *o*-фенантролину. На зимограмме видна одна полоса, соответствующая пептиду с молекулярной массой 35 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе зрелого продукта гипотетической металлопротеиназы *M. morganii*.

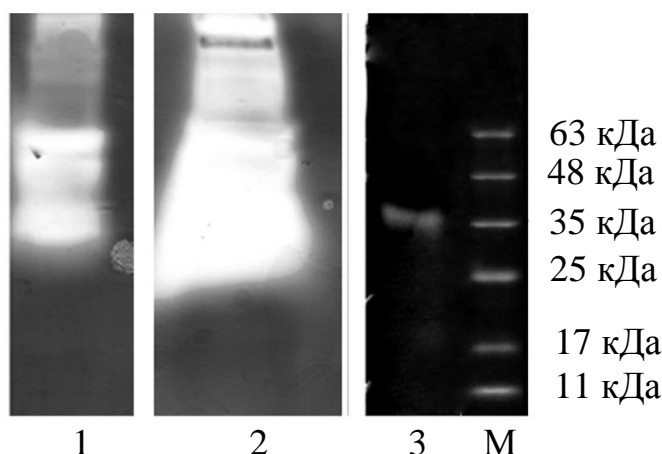


Рисунок 13. Зимограмма белковых фракций клеточного лизата *M.morganii* ZM на разных стадиях очистки. 1 – исходный лизат, 2 – фракция 20-50% насыщения сульфатом аммония, 3 - зимография белковой фракции после фенилсефарозы с протеолитической активностью, чувствительной к *o*-фенантролину, М – маркеры.

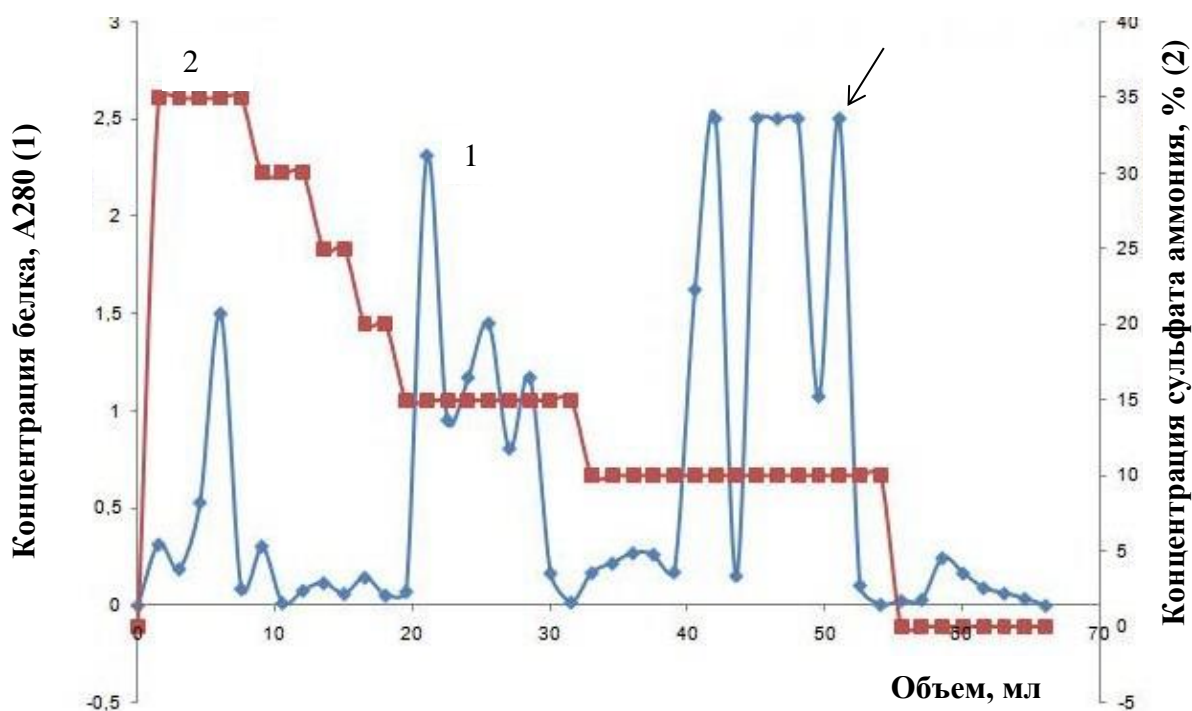


Рисунок 14. Хроматография белков *M. morganii* ZM на фенилсефарозе. Активная фракция указана стрелкой. 1 – концентрация белка, A_{280} . 2 – концентрация сульфата аммония, %.

Таким образом, в клетках бактерий *M. morganii* ZM идентифицировали металлопротеиназу, расщепляющую актин, азоказеин и желатин. С помощью двухстадийной очистки с использованием сульфатаммонийного фракционирования и гидрофобной хроматографии из клеточного лизата был выделен препарат фермента, активность которого ингибировалась в присутствии *o*-фенантролина и не ингибировалась в присутствии ингибитора

сериновых протеиназ – PMSF. Молекулярная масса металлопротеиназы составила 35 кДа.

Итак, мы исследовали влияние бактерий *P. mirabilis* и *M. morganii* на жизнеспособность клеток HeLa и их адгезию, инвазивную активность данных энтеробактерий и изменение морфологии эукариотических клеток при инвазии. Исследовали также наличие протеолитических ферментов в клетках и культуральной жидкости бактерий. Показали, что обе культуры инвазируют эукариотические клетки, вызывая реорганизацию актинового цитоскелета. При этом эффективность инвазии зависела от стадии роста культуры и инфицирующей дозы бактерий. Культуральная жидкость *P. mirabilis* вызывала деструкцию монослоя клеток HeLa. Провели поиск и биоинформационный анализ генов обнаруженных протеиназ. Из клеток *M. morganii* выделили металлопротеиназу с молекулярной массой 35 кДа. Также показали, что мочевины повышает продуктивность внеклеточной протеиназы *P. mirabilis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование инвазивной активности двух уropатогенных штаммов близкородственных видов бактерий *P. mirabilis* и *M. morganii*, относящихся к трибе *Proteeae*, с использованием количественного (гентамицинового) и качественного (конфокальной микроскопии) методов позволили выявить значительные различия во влиянии этих бактерий на культуру клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa. Мы установили, что бактерии обоих штаммов способны инвазировать эпителиальные клетки М HeLa. Однако бактерии штамма *P. mirabilis* 5127-1 оказывали цитотоксический эффект на эпителиальные клетки, в отличие от бактерий штамма *M. morganii* ZM, что выражалось в значительном нарушении монослоя культуры клеток и откреплении клеток от субстрата. Выявленный эффект коррелировал с наличием у бактерий *P. mirabilis* внеклеточной протеолитической активности.

Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие основные заключения:

1. Инвазивная активность бактерий *M. morganii* ZM и *P. mirabilis* 5127-1 зависит от возраста бактерий, соотношения бактериальных и эукариотических клеток, а также времени инкубации клеток. Наиболее эффективно инвазируют бактерии, находящиеся на экспоненциальной фазе роста (12 ч). При этом эффективность инвазии *M. morganii* ZM максимальна при 4 ч инкубирования и соотношении эукариотических клеток к бактериальным 1:100, а эффективность инвазии *P. mirabilis* 5127-1 – при 2 ч инкубирования и соотношении клеток 1:50.

2. Установлены морфологические изменения клеток М HeLa при инвазии бактерий *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Показано, что инвазия бактерий вызывает перестройку актинового скелета клеток HeLa, образование протрузий. Инвазия бактерий *P. mirabilis*, в отличие от *M. morganii*, сопровождается

нарушением монослоя культуры клеток, обусловленным внеклеточной протеолитической активностью бактерий.

3. Скрининг протеолитической активности позволил установить различия штаммов: *P. mirabilis* 5127-1 проявляет высокую внеклеточную протеолитическую активность, внутриклеточная протеолитическая активность обнаружена в бактериях *M. morganii* ZM. Активность внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis* 5127-1 повышается в присутствии мочевины в среде культивирования; фермент образует 2 изоформы, образование второй изоформы фермента зависит от состава среды культивирования.

4. В геноме клинического изолята *M. morganii* ZM идентифицирован ген гипотетической внутриклеточной металлопротеиназы протяженностью 1104 п.о. Установлено, что фермент относится к семейству M4 нейтральных пептидаз суперсемейства глутинкинов.

5. Функционально активный белок металлопротеиназы *M. morganii* ZM с молекулярной массой 35 кДа выделен в виде высокоочищенного препарата. В отличие от гримелизина, металлопротеиназа *M. morganii* ZM расщепляет молекулу актина неспецифически.

Таким образом, установлено, что протеолитическая активность условно-патогенных энтеробактерий может определять особенности их инвазии в эукариотические клетки. Металлопротеиназы бактерий могут влиять на развитие инфекции в организме либо как факторы вирулентности, либо как регуляторы экспрессии вирулентных свойств. Поэтому изучение структуры и функций металлопротеиназ патогенных бактерий, выяснение вклада этих ферментов в вирулентный потенциал важно не только с фундаментальной точки зрения, но и актуально для поиска мишеней в терапии и разработки новых стратегий лечения оппортунистических инфекций.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Замалютдинова, Н.М. Новая металлопротеиназа *Morganella morganii* ZM / Н.М. Замалютдинова, Л.Ф. Миннуллина, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова // Биоорг. Химия. – 2014. – Т. 40, № 6. – с. 682-687. – (перечень ВАК), автора – 0.125 пл.
2. Замалютдинова, Н.М. Особенности биосинтеза внеклеточной металлопротеиназы *Proteus mirabilis* / Н.М. Замалютдинова, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная, Е.С. Божокина, А.М. Марданова // Известия РАН. Сер. биол. – 2015. – №1. – с. 27-33. – (перечень ВАК), автора – 0.109 пл.
3. Замалютдинова, Н.М. Сравнительная характеристика инвазивной способности энтеробактерий *Proteus mirabilis* и *Morganella morganii* / Н.М. Замалютдинова, Н.М. Богомольная, И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова // Гены и Клетки. – 2014. – Т. 9, № 3. – с. 195-198. – (перечень ВАК), автора – 0.08 пл.
4. Замалютдинова, Н.М. Протеолитическая активность бактерий трибы *Proteeae* / Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 10. – с. 191-194. – (перечень ВАК), автора – 0.06 пл.

5. Замалютдинова, Н.М. Влияние глюкозы и мочевины на рост *Proteus mirabilis* и биосинтез внеклеточной протеиназы / Н.М. Замалютдинова, Л.Ф. Миннуллина, А.Г. Гиляева, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, Н.Л. Рудакова, А.М. Марданова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 19. – с. 184-187. – (перечень ВАК), автора – 0.06 пл.

6. Миннуллина, Л. Ф. Ген металлопротеиназы *Morganella morganii* / Л.Ф. Миннуллина, **Н.М. Замалютдинова**, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 23. – с. 143-146. – (перечень ВАК), автора – 0.06 пл.

Другие публикации по теме диссертации

1. Миннуллина, Л.Ф. Идентификация гена металлопротеазы в геномах клинических изолятов *Morganella morganii* / Л.Ф. Миннуллина, **Н.М. Замалютдинова**, А.М. Марданова // БИОЛОГИЯ НАУКА XXI ВЕКА: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20 - 24 апреля 2015 г.): сборник тезисов – Пущино, 2015. – с. 102-103.

2. Замалютдинова, Н.М. Новая металлопротеиназа *Morganella morganii* ZM / Н.М. Замалютдинова, Л.Ф. Миннуллина, А.О. Арапова // БИОЛОГИЯ НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21 - 25 апреля 2014 г.): сборник тезисов – Пущино, 2014. – с. 205.

3. Замалютдинова, Н.М. Внеклеточная протеиназа *Proteus mirabilis*: поиск гомологов и характеристика биосинтеза / Н.М. Замалютдинова, А.Г. Гиляева, А.М. Марданова, Л.Ф. Миннуллина // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине". – Казань, 2014. – с. 121.

4. Миннуллина, Л.Ф. Металлопротеиназа *Morganella morganii* ZM: идентификация и клонирование гена / Л.Ф. Миннуллина, **Н.М. Замалютдинова**, А.М. Марданова // Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция. VII Всероссийская конференция (Петрозаводск, 30 июня - 4 июля 2014 г.): Тез. докл. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – с. 88.

5. Замалютдинова, Н.М. Инвазия *Morganella morganii* ZM в клетки HeLa / Н.М. Замалютдинова, Л.Ф. Миннуллина, А.М. Марданова // Материалы VI ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – М., 2014. – с. 105.

6. Миннуллина, Л.Ф. Изучение экспрессии гена металлопротеазы *Morganella morganii* ZM / Л.Ф. Миннуллина, **Н.М. Замалютдинова**, А.М. Марданова // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых – Материалы и технологии XXI века. – Казань: Изд-во КФУ, 2014. – с. 45.

7. Миннуллина, Л.Ф. Биоинформационный анализ гена металлопротеазы *Morganella morganii* ZM / Л.Ф. Миннуллина, **Н.М. Замалютдинова** // Сборник трудов международного симпозиума "Биохимия – основа наук о жизни". - Казань: Казанский федеральный университет, 2013. – с. 145-146.

8. Миннуллина, Л.Ф. Идентификация гена металлопротеазы в геноме *Morganella morganii* 58 / Л.Ф. Миннуллина, А.О. Арапова, **Н.М. Замалютдинова**, А.М. Марданова //

Материалы V международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины". – Ростов-на-Дону: изд.-во Южного федерального университета, 2013. – с. 35-36.

9. Бондырева, Н.М. Особенности биосинтеза внеклеточных протеиназ *Proteus mirabilis* / Н.М. Бондырева, А.М. Марданова // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества: прошлое, настоящее, будущее», посвященного 90-летию Заслуженного профессора МГУ Николая Сергеевича Егорова. – Москва: Издательство Макс Пресс, 2011. – с. 21.

10. Бондырева, Н.М. Внеклеточные протеиназы *Proteus mirabilis* – особенности биосинтеза / Н.М. Бондырева // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". – Новосибирск: 2010. – с. 159.

11. Бондырева, Н.М. Внеклеточная протеолитическая активность *Proteus mirabilis* / Н.М. Бондырева // Материалы Международного молодежного научного форума "Ломоносов-2010". Москва: 2010. – с. 161-162.

12. Бондырева, Н.М. Особенности биосинтеза внутриклеточных протеиназ *Serratia grimesii* / Н.М. Бондырева, Е.В. Долгова, А.М. Марданова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века». Москва: 2011. – с. 21-22.

Используемые сокращения

ECP - *Escherichia coli* protein - белок *Escherichia coli*

EMEM - Eagle's minimum essential medium - минимальная среда Игла

FBS - fetal bovine serum - эмбриональная бычья сыворотка

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан

SDS – sodium dodecyl sulfate - додецил сульфат натрия

ПААГ – полиакриламидный гель

BLAST - basic local alignment search tool - основной локальный инструмент поиска выравниваний

КОЕ – колониеобразующая единица

КЖ – культуральная жидкость

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол

ОРС – открытая рамка считывания

H - гистидин

E – глутаминовая кислота

E-mail автора: nelya-zamalutdinova@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Email: ziabramova@mail.ru